

*На правах рукописи*



**Лебедева Юлия Анатольевна**

**ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА И ОБЩЕЙ АНЕСТЕЗИИ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ  
АКТИВНОСТЬ В ПЕРВИЧНОЙ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЕ  
ГОЛОВНОГО МОЗГА НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС**

03.03.01 – физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2017

Работа выполнена на базе НИЛ «Нейробиология» кафедры физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины и биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (г. Казань).

**Научный руководитель:** **Ситдикова Гузель Фаритовна**  
доктор биологических наук, профессор,  
заведующий кафедрой физиологии человека и  
животных Института фундаментальной  
медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский  
(Приволжский) федеральный университет».

**Официальные оппоненты:** **Раевский Владимир Вячеславович**  
доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией Нейроонтогенеза  
Института высшей нервной деятельности и  
нейрофизиологии РАН, г. Москва.

**Балыкин Михаил Васильевич**  
доктор биологических наук, профессор,  
заведующий кафедрой адаптивной физической  
культуры Института медицины, экологии и  
физической культуры ФГБОУ ВО «Ульяновский  
государственный университет» (УлГУ), г.  
Ульяновск.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
образования «Московский государственный  
университет имени М.В.Ломоносова», г.  
Москва.

Защита диссертации состоится «25» мая 2017 года в «13:00» на заседании диссертационного совета Д 212.081.36 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420055, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74, в зале заседания ученого совета (аудитория 205А).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор



Абрамова З.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

В настоящее время исследование особенностей развивающегося мозга и факторов, влияющих на нормальное функционирование нейрональных сетей в онтогенезе, является актуальной проблемой нейрофизиологии. Известно, что физиологический апоптоз во время критического периода развития нервной системы является необходимым условием для формирования нейрональных связей, путей и структур (Buss et al., 2006; Oppenheim et al., 1991). Вместе с тем массивная нейродегенерация, вызываемая различными повреждающими факторами, может привести как к морфологическим нарушениям, так и долговременным функциональным изменениям мозга и, как следствие, поведения (Rohn et al., 2009; Ribe et al., 2008; Mattson et al., 2006; Viswanath et al., 2001). Накопленные за последние десятилетия данные свидетельствуют о том, что вещества, которыми иногда злоупотребляют беременные женщины, такие как алкоголь, кетамин и бензодиазепины, а также некоторые классы лекарственных средств, часто используемых в педиатрии и у беременных, в том числе общие анестетики и антиэпилептические медикаменты на ранних этапах развития могут оказывать опасные вторичные эффекты, включая массивную запрограммированную смерть клеток мозга (Creeley et al., 2013; Léveillé et al., 2010; Patel et al., 2009; Jevtovic-Todorovic et al., 2003; Ikonomidou et al., 2000). Так, воздействие этанола на этапе внутриутробного развития человека может привести к целому ряду нейроповеденческих дефектов, клинически объединяемых в фетальный алкогольный спектр нарушений, который может быть диагностирован с раннего детства, при этом его симптомы зачастую сохраняются на протяжении всей жизни (Sadrian et al., 2013). Фетальный алкогольный синдром является наиболее тяжелым состоянием, включающим характерные черепнолицевые пороки, замедление роста и аномалии развития нервной системы (Jones et al., 1973).

Первая неделя жизни у грызунов является ранней стадией «быстрого развития мозга», во время которой с наибольшей скоростью происходят морфологическая и функциональная дифференциация нейронов, а также формирование синаптических связей (Ben-Ari et al., 2001). Данный период приблизительно соответствует периоду от 20 до 30 недель гестации человеческого плода (Clancy et al., 2007; Clancy et al., 2001; Dobbing et al., 1979). Физиологическая активность в развивающемся мозге характеризуется уникальными паттернами электрической активности (Colonnese et al., 2012; Blankenship et al., 2010; Khazipov et al., 2006). У крыс во время первой недели после рождения активность коры головного мозга представлена всплесками осцилляторной активности в альфа-бета и гамма частотных диапазонах (Yang et al., 2013; Minlebaev et al., 2011; Yang et al., 2009; Khazipov et al., 2004), генерируемых в нейрональных таламокортикальных сетях, при этом в сенсорных зонах коры они эффективно запускаются входами с сенсорной периферии (Khazipov et al., 2004). Схожие паттерны активности характерны и для человеческого мозга во время второй половины внутриутробного развития (Colonnese et al., 2010; André et al., 2010; Milh et al., 2007). Мозг новорожденных

грызунов в этот временной промежуток так же, как и внутриутробно развивающийся мозг приматов особенно чувствителен к апоптогенным воздействиям этанола и общей анестезии (Olney, 2014; Creeley et al., 2013).

Известно, что ранняя нейрональная активность не только играет роль в синаптической пластичности, но и способствует выживанию нейронов, предотвращая апоптоз в процессе развития (Léveillé et al., 2010; Heck et al., 2008; Mennerick et al., 2000). Действительно, вещества, ингибирующие рецепторы N-метил-D-аспарагиновой кислоты (НМДА) и усиливающие функции рецепторов гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), вызывали массивный апоптоз в мозге у новорожденных грызунов и у приматов в процессе внутриутробного развития (Olney, 2014; Jevtovic-Todorovic et al., 2003; Ikonomidou et al., 2000; Ikonomidou 1999).

Несмотря на интенсивные исследования мишеней действия этанола и общих анестетиков, данные об эффектах данных веществ на электрическую активность мозга в ранний период развития *in vivo* отсутствуют. С учетом критического влияния активности нейронов на выживание и нормальное формирование синаптических связей исследование нейротоксического воздействия этанола и общей анестезии на электрическую активность развивающегося мозга, несомненно, является актуальной задачей нейробиологии развития.

**Цель исследования** – изучение влияния этанола и общей анестезии на спонтанную и сенсорно вызванную электрическую активность первичной соматосенсорной коры головного мозга крыс.

**В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:**

- 1) Исследовать возрастную и концентрационную зависимость воздействия этанола на электрическую активность и апоптоз в первичной соматосенсорной коре крыс.
- 2) Охарактеризовать эффекты ингаляционного анестетика изофлурана на спонтанную и сенсорно вызванную электрическую активность первичной соматосенсорной коры крыс в процессе развития.
- 3) Изучить влияние комбинированного введения общих анестетиков кетамина и мидазолама на электрическую активность первичной соматосенсорной коры крыс в течение первой недели жизни.

**Научная новизна работы**

В настоящей работе впервые было показано, что этанол подавляет спонтанную активность, а также сенсорно вызванные осцилляторные всплески активности в первичной соматосенсорной коре новорожденных крыс в течение первой недели после рождения. В этот же период развития апоптоз, инициируемый этанолом, достигает своего пика. При этом наблюдается корреляция данных электрофизиологических экспериментов с концентрационной зависимостью апоптогенных эффектов этанола. Также впервые выявлено, что общие анестетики – изофлуран, кетамин и мидазолам угнетают электрическую активность в первичной соматосенсорной коре новорожденных крыс. При этом было показано, что эффекты изофлурана качественно отличаются у животных первой недели жизни и более взрослых особей. Так, на протяжении первой постнатальной недели изофлуран полностью угнетал спонтанную электрическую активность коры и подавлял сенсорно вызванные ранние осцилляторные

паттерны, в то время как у животных старших возрастов анестетик вызывал специфические паттерны эпилептиформных разрядов, чередующихся с периодами подавления активности. Кроме того, впервые показано, что комбинированное введение кетамина и мидазолама в дозах, эквивалентных применяемым при хирургической анестезии, вызывает практически полное подавление спонтанной электрической активности, а также значительное снижение осцилляторной составляющей вызванного сенсорной стимуляцией ответа в соматосенсорной зоне коры головного мозга новорожденных крыс.

### **Научно-практическая ценность работы**

Полученные в работе данные имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Поскольку период первой недели после рождения крысы приблизительно соответствует периоду от 20 до 30 недель гестации человеческого плода (Clancy et al., 2007; Clancy et al., 2001; Dobbing et al., 1979), мозг новорожденных грызунов в этот временной промежуток, как и внутриутробно развивающийся мозг приматов, особенно чувствителен к апоптогенным воздействиям этанола и общей анестезии. Полученные результаты раскрывают причины нейротоксических эффектов продолжительной экспозиции к этанолу и анестетикам на ранних этапах развития, сопровождающейся возникновением долговременных психоневрологических нарушений. В настоящем исследовании приведено доказательство в пользу гипотезы о том, что в основе нарушений развития нервной системы, возникающих в результате воздействия этанола и общих анестетиков, может лежать подавление электрической активности, что является механизмом, стимулирующим апоптоз, и приводит к гибели значительного количества нейронов.

Кроме того, полученные данные могут иметь значение для практической медицины. Поскольку процедуры анестезии становятся все более сложными и продолжительными, минимизация рисков, возникающих в процессе использования общих анестетиков, является одним из наиболее важных аспектов в клинической практике. Полученные в настоящей работе данные предполагают возможность проведения дальнейших трансляционных исследований влияния препаратов общей анестезии на активность мозга плода и недоношенных новорожденных, что позволит отслеживать потенциально опасные эффекты для здоровья плода и новорожденного. Аналогично, выявленное в настоящем исследовании ингибирующее воздействие этанола на электрическую активность неонатального мозга, коррелирующее с его апоптогенными эффектами, предполагает возможность оценки потенциально повреждающего действия алкоголя на мозг плода и новорожденного посредством анализа изменений параметров кортикальной активности мозга.

### **Методы исследования**

Исследование электрической активности мозга крыс, возникающей спонтанно и в ответ на сенсорную стимуляцию, проводилось с использованием электрофизиологических внутрикортикальных регистраций в условиях *in vivo*. Внеклеточная регистрация активности в области представительства конечностей и вибрисс первичной соматосенсорной коры крыс осуществлялась с помощью многоканальных электродов на кремниевой основе. Для характеристики нейроапоптогенных эффектов этанола в период постнатального развития крыс

применялся иммуногистохимический метод выявления активированной каспазы-3 и апоптотического разрушения ядер нейронов с помощью ДНК красителя DAPI.

### **Достоверность полученных данных**

Достоверность полученных данных основана на большом объеме результатов экспериментальных исследований с использованием адекватных методологических подходов и статистической обработки результатов.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1) Этанол оказывает ингибирующие эффекты на электрическую активность первичной соматосенсорной коры мозга крыс, которые характеризуются концентрационной и возрастной зависимостями. Подавление кортикальной активности максимально выражено в период первой постнатальной недели, что коррелирует со степенью апоптотической нейродегенерации, возникающей в результате воздействия этанола.

2) Изофлуран полностью угнетает электрическую активность первичной соматосенсорной коры крыс во время первой постнатальной недели, при этом эффекты анестетика изменяются в процессе развития от полного ингибирования до инициации паттернов эпилептиформных разрядов, чередующихся с периодами подавления активности.

3) Общая анестезия с использованием комбинированного введения кетамина и мидазолама приводит к практически полному подавлению электрической активности в первичной соматосенсорной коре головного мозга новорожденных крыс.

### **Личный вклад диссертанта в исследования**

Приведенные в работе данные получены при личном участии соискателя на всех этапах работы, включая составление плана исследования, проведение экспериментов, обработку полученных данных и оформление публикаций.

### **Апробация и реализация результатов исследования**

Основные результаты диссертационной работы представлены на Международных научных конференциях Казанского федерального университета «From Neuron to Brain» (Казань, 2013), «Современные технологии в нейробиологии» (Казань, 2013) и «Трансляционная медицина, настоящее и будущее» (Казань, 2016); научно-практической конференции Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН «Доклинические исследования: современные методы и возможности» (Москва, 2014); Международной научной конференции «Science of the Future» (Санкт-Петербург, 2014).

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе – 5 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, включенных в систему цитирования Web of Science и рекомендованных ВАК.

Работа выполнена при поддержке грантом Правительства РФ ведущим ученым №11.G34.31.0075, грантом РФФИ № 14-04-31344, а также программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация изложена на 145 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания методики исследования, результатов, их обсуждения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, а также списка

цитируемой литературы. Диссертация иллюстрирована 30 рисунками и 1 таблицей. Список цитируемой литературы включает 272 источника, из них 272 – иностранных авторов.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

**Подготовка животного к эксперименту.** Эксперименты выполнялись с соблюдением этических норм, принятых этическим комитетом Казанского государственного медицинского университета по защите прав и использованию животных в экспериментальных целях (N9-2013).

Эксперименты проводились на крысах линии Вистар обоих полов возраста от 1 до 69 постнатальных (P) дней (день рождения принимался за P0). Схема эксперимента представлена на рисунке 1. Во время хирургического вмешательства использовался ингаляционный анестетик изофлуран. В процессе регистрации фиксация головы животного осуществлялась с помощью крепления трубочек к раме стереотаксического аппарата. В качестве заземляющего электрода использовалась хлорированная серебряная проволока, которая вводилась в область зрительной коры или мозжечка.

Данные, представленные для каждой концентрации изофлурана (Baxter Healthcare, США) (0,5-2%), были получены не менее чем через 15 мин с момента ее изменения. При изучении воздействия 20% этанола (ООО «Гиппократ», Россия), кетамина (Meriel, Франция) и мидазолама (Sigma-Aldrich, США) на активность первичной соматосенсорной коры (S1) новорожденных крыс инъекции исследуемых веществ производились внутрибрюшинно (в/б) в концентрациях, соответствующих протоколам экспериментов. В контрольной серии экспериментов использовался физиологический раствор (в/б), введение которого не оказывало существенного влияния на кортикальную активность мозга крыс.

**Внеклеточная регистрация электрической активности.** Регистрация локальных полевых потенциалов и множественных потенциалов действия осуществлялась с помощью многоканальных электродов (Neuronexus Technologies, США) на кремниевой основе с 16 или 32 регистрирующими площадками диаметром около 15 мкм и с шагом 100 мкм (рис. 1 Б). Электрод вводился в область S1 – в представительство вибрисс или конечностей перпендикулярно поверхности на глубину 1,5 мм, что позволяло регистрировать спонтанную и вызванную активность во всех слоях кортикальной колонки. Спонтанные движения регистрировались с помощью пьезоэлектрических детекторов (рис. 1 А).

Сенсорная стимуляция осуществлялась с помощью 8-канального электростимулятора Master-8 (А.М.Р. Instruments, Израиль) и адаптера ISO-Flex (А.М.Р. Instruments, Израиль) путем отклонения вибриссы в направлении, обратном ее росту, или кратковременных (10 мс) прикосновений к поверхности кожи стержнем, прикрепленным к пьезоэлектрическому актуатору. Топографичный участок кожи конечности или основная вибрисса, соответствующие представительству в кортикальной колонке, определялись по

минимальному латентному периоду (задержке) множественных потенциалов действия, возникавших в четвертом слое (L4) в ответ на раздражение.

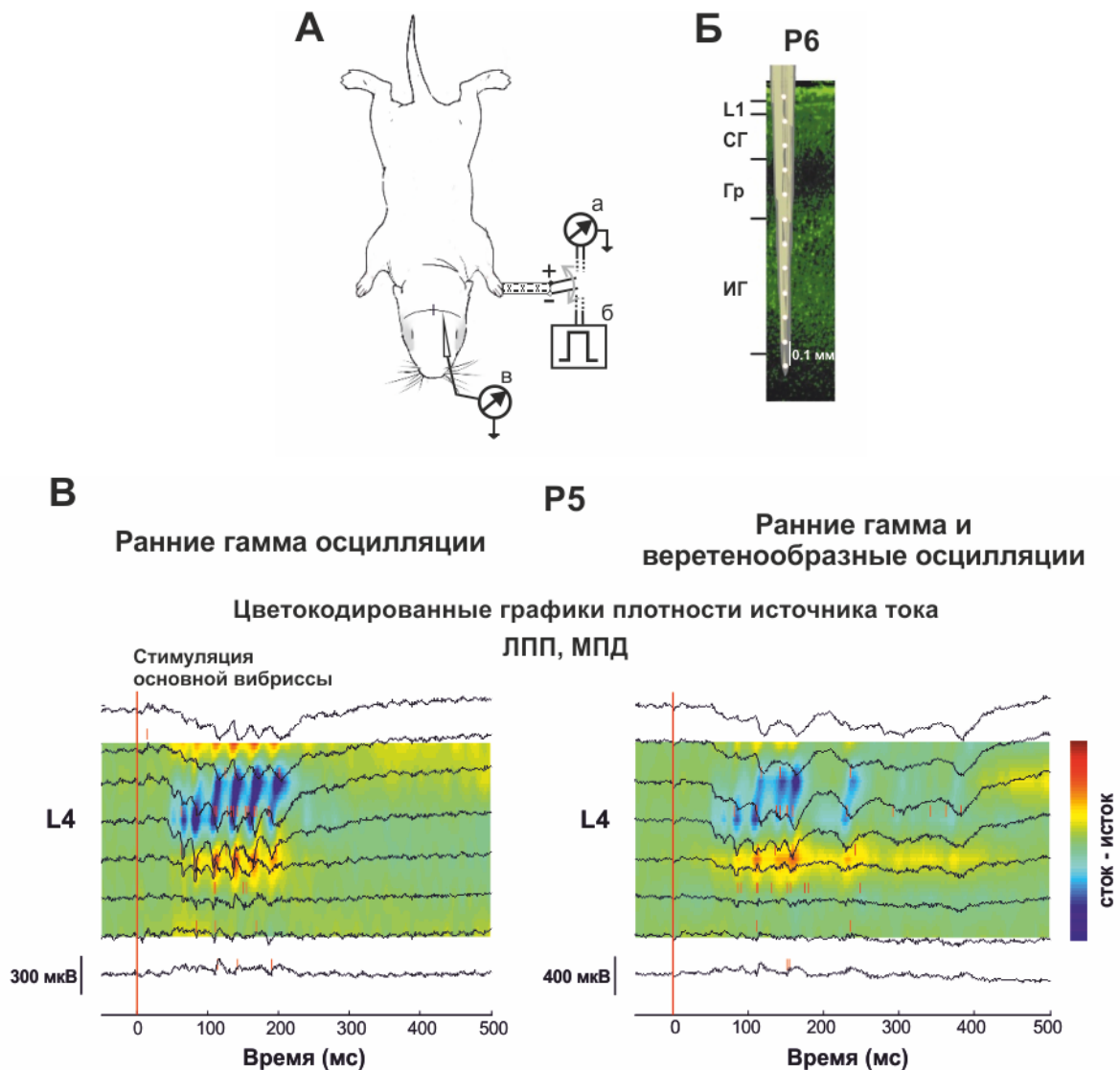


Рисунок 1 – Схема эксперимента и примеры осцилляторных паттернов ранней кортикальной активности мозга. (А) Схема эксперимента для регистрации электрической активности в S1 новорожденной крысы. На схеме показаны: (а) пьезоэлектрический детектор, детектирующий движения животного; (б) электростимулятор; (в) усилитель. (Б) Многоканальный электрод, наложенный на срез мозга крысы в возрасте Р6. На срезе отмечены слои S1: первый (L1), супрагранулярный (СГ), гранулярный (Гр) и инфрагранулярный (ИГ). (В) Примеры осцилляторных паттернов ранней кортикальной активности мозга новорожденной крысы в возрасте Р5. Сенсорные ответы, вызванные стимуляцией основной вибриссы, в состав которых входят сенсорно вызванные потенциалы, а также ранние гамма (30-80 Гц) осцилляции (слева) и сочетание ранних гамма и веретенообразных (8-30 Гц) осцилляций (справа). ЛПП – локальные полевые потенциалы – черные линии; МПД – множественные потенциалы действия – красные вертикальные линии, наложенные на цветокodированный график плотности источника тока на разной глубине кортикальной колонки. Сток (англ. «sink») – область оттока внеклеточных положительных зарядов (деполяризация мембраны) – отображается градациями синего цвета; исток (англ. «source») – область притока внеклеточных положительных зарядов – отображается градациями красного цвета.



В представленных экспериментах в контрольных условиях кратковременное (10 мс) отклонение основной вибриссы либо прикосновение к топографической области поверхности кожи передней конечности вызывало характерный осцилляторный ответ в соответствующей зоне S1 крыс в возрасте P2-7, состоящий из сенсорно вызванного потенциала и следующих за ним гамма (30-80 Гц) и веретенообразных (8-30 Гц) осцилляций (рис. 1 В). Сенсорно вызванный потенциал и последующие сенсорно вызванные вспышки кортикальной активности сопровождалась максимальными отклонениями локального полевого потенциала в L4, где также наблюдались области деполяризации большинства нейронов во время вызванных осцилляторных паттернов и наибольшая плотность множественных потенциалов действия (рис. 1 В). Кроме того, следует отметить наличие значительной степени корреляции между вспышками нейрональной активности и движениями животных.

Электрические сигналы усиливались и фильтровались (10000X; полоса пропускания 0,5 Гц – 9 кГц) с помощью 128-канального усилителя Digital Lynx SX (Neuralynx, США) либо несерийного усилителя (А. Алексеев, Россия). Далее они оцифровывались с частотой дискретизации 10, 25 или 32 кГц (разрешение по напряжению 0,5 мкВ) и сохранялись для последующего анализа.

Спонтанная и сенсорно вызванная активность регистрировалась в течение 1 часа, затем производилась подача изофлурана, либо введение комбинации кетамина и мидазолама (в/б) или этанола (20% в физиологическом растворе, в/б). После этого осуществлялась запись спонтанной и сенсорно вызванной активности в течение 3-4 часов.

**Анализ данных.** Исходные данные предварительно обрабатывались с помощью программ пакета Matlab (MathWorks, США). Для детекции множественных потенциалов действия исходный сигнал фильтровался в диапазоне 300-3000 Гц. Потенциалами действия считались отрицательнополярные отклонения локального полевого потенциала, превышающие по амплитуде 3-5 дисперсий от базовой линии в зависимости от возраста животного. На всех рисунках положительная полярность сигналов показана как отклонение вверх. Сенсорно вызванный потенциал определялся как первое следующее за стимулом отклонение потенциала в L4.

Для анализа сенсорно вызванных осцилляций (бёрстов – вспышек электрической активности) использовался следующий за сенсорно вызванным потенциалом период записи длительностью 500 мс. В качестве уровня базовой активности оценивался участок записи, предшествующий стимулу, длительность которого составляла 200 мс. Локальные полевые потенциалы и множественные потенциалы действия детектировались и анализировались с применением авторских программ в среде Matlab. Спектральный анализ осуществлялся с помощью пакета программ Chronux для Matlab.

Выявление спонтанных гамма и веретенообразных осцилляций (бёрстов) осуществлялось следующим образом: 1) сигналы локальных полевых потенциалов фильтровались в диапазоне 30-80 Гц для гамма и 8-30 Гц для веретенообразных осцилляций; 2) детектировались периоды электрической активности, в которых амплитуда колебаний превышала фоновые в 3-5 раз; 3) гамма и веретенообразные осцилляции определялись как колебания, которые

включали в себя минимум три цикла периодичностью менее 30 и 120 мс, соответственно, при этом необходимым условием было наличие потенциалов действия в составе осцилляций.

**Статистика.** Статистический анализ производился с использованием инструментов пакета Matlab. С помощью теста Колмогорова-Смирнова определялось соответствие полученного набора данных нормальному распределению. Для нормально распределённых данных сравнение выборок производилось с использованием метода ANOVA, в случае несоответствия данных нормальному распределению использовался двусторонний ранговый тест Уилкоксона. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка либо как медиана и 25 и 75 процентиля (медиана [25%-75%]). Для выявления полулетальной дозы этанола (ЛД50) применялся статистический пробит-анализ.

**Определение токсичных доз и концентраций этанола в крови.** В экспериментах по определению токсичных доз этанола было использовано 78 крыс в возрасте P1-7. Инъекции этанола (20%, в/б) производились одиннадцати группам животных в концентрациях: 2,5; 3,7; 6; 6,7; 7,4; 8,2; 9; 11; 12,5; 13,7 и 15 г/кг. Наблюдение за крысами осуществлялось в течение 6 часов с момента введения вещества. В результате определения токсичных доз этанола статистический пробит-анализ показал, что полулетальная доза (ЛД50) этанола составляет 11,45 г/кг (доверительный интервал 10,59-12,26 г/кг), а также что доза, равная 14,26 г/кг (доверительный интервал 13,22-16,46 г/кг) в 95% случаях является летальной. Ни одно животное не умерло после введения менее 9 г/кг этанола.

Для определения концентраций этанола в крови крыс было использовано 25 животных в возрасте от P5 до P7. Инъекции этанола (20%, в/б) производились в концентрациях: 1 г/кг, 1+3 г/кг (с интервалом в 1 час) и 6 г/кг. Каждая концентрация вводилась 8 крысам. Контрольным животным инъецировали физиологический раствор (в/б). Концентрации этанола в крови определялись через 1 и 4 часа после инъекции в судебно-химическом отделении ГАУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы МЗ РТ» с помощью газового хроматографа «Кристаллюкс-4000М» (НПФ «Мета-хром», Россия). При этом химическое исследование крови новорожденных крыс показало, что при введении концентрации 1 г/кг, количество этанола в крови в среднем составляло: через 1 час после введения 36 мг/дл, через 4 часа – 4,6 мг/дл; при введении 1 + 3 г/кг, количество этанола в крови в среднем составляло: через 1 час после введения 266 мг/дл, через 4 часа – 237 мг/дл; при введении 6 г/кг, количество этанола в крови в среднем составляло: через 1 час после введения 355 мг/дл, через 4 часа – 388 мг/дл ( $p < 0,05$ ,  $n = 16$ ). Было показано, что поддержание концентрации этанола в крови крыс в течение 4 часов на уровне 200 мг/дл и выше являлась необходимым условием для запуска нейродегенерации, а также, что апоптогенный эффект этанола усиливался и распространялся пропорционально продолжительности времени, в течение которого его концентрация в крови сохранялась выше этого уровня (Ikonomidou et al., 2000).

**Выявление нейроапоптогенных эффектов этанола в первичной соматосенсорной коре крыс.** Срезы мозга инкубировались в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) с содержанием первичных антител к активированной

каспазе-3 (ASP 175) (Cell Signalling Technology Inc., США), разведенных в 1000 раз, после чего выдерживались в растворе PBS, содержащем вторичные флуоресцентные Cy3 антитела ослы аффинной очистки к IgG (H+L) кролика (secondary fluorescent antibodies Cy3 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L); Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., США), разведение 1:1000. По окончании инкубации срезы промывались водой и фиксировались в гистологической среде, содержащей ДНК краситель DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид) (Vector Laboratories Inc., США).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **1. Влияние этанола на электрическую активность и апоптоз в первичной соматосенсорной коре крыс**

#### **1.1 Эффекты этанола на спонтанную электрическую активность первичной соматосенсорной коры крыс**

В течение первой недели после рождения спонтанная активность в контрольных условиях характеризовалась бёрстами, возникающими в среднем [квартильный диапазон 25%-75%] с частотой 2,7 [0,6-5,2] мин<sup>-1</sup> и включающими осцилляции в диапазоне гамма и альфа-бета частот, ассоциированными с множественными потенциалами действия (P1-7, n = 14) (рис. 2 А). Инъекция этанола (6 г/кг, в/б) новорожденным крысам приводила к быстрому и практически полному угнетению кортикальной активности. У крыс в возрасте P5-7, в результате введения этанола веретенообразные и ранние гамма осцилляции блокировались (рис. 2). Подавление бёрстов было опосредовано значительным снижением частоты спонтанных множественных потенциалов действия с 1,40 [0,80-2,40] до 0,04 [0,02-0,14] с<sup>-1</sup> спустя 1 час после введения этанола. Этанол также угнетал движения конечностей/тела, при этом их частота уменьшалась с 8,4 [5,8-11,5] до 0,7 [0,3-1,3] мин<sup>-1</sup> (рис. 2 Г). Процесс мощного ингибирования бёрстов, множественных потенциалов действия и движений конечностей/тела новорожденных крыс начинался в течение нескольких минут после инъекции этанола и сохранялся на протяжении всего четырехчасового периода регистрации электроэнцефалограммы (ЭЭГ).

Для анализа дозозависимых эффектов этанола на электрическую активность крыс в возрасте P4-7 были использованы следующие концентрации: 1 г/кг, 1+3 г/кг (с интервалом в 1 час), 4,5 г/кг и 6 г/кг. Этанол в дозе 1 г/кг (P4-5, n = 6) практически в два раза снижал количество множественных потенциалов действия, ранних гамма и веретенообразных осцилляций в S1 (до 58 [49-79]% и 56 [34-90]%, соответственно, без каких-либо изменений мощности осцилляций), а также частоту движений животного (рис. 2). При введении этанола в концентрациях 1+3 г/кг (с интервалом в 1 час) и 4,5 г/кг, активность в S1 в значительной степени уменьшалась. При этом наблюдалось угнетение множественных потенциалов действия до 18 [4-27]% и частоты возникновения бёрстов до 8 [5-29]%, включающих веретенообразные до 8 [2-23]% и ранние гамма осцилляции до 7 [5-20]%. Наряду с этим отмечалось снижение мощности веретенообразных и ранних гамма осцилляций до 9 [7-22]% и 33 [25-54]%, соответственно, а также частоты

движений животного до 16 [12-29]% (объединенные данные для концентраций 1+3 и 4,5 г/кг) (P4-6, n = 11). Наиболее сильный эффект ингибирования активности этанолом наблюдался при концентрации 6 г/кг. Результаты экспериментов, в которых использовалась данная концентрация, показали, что частота возникновения множественных потенциалов действия, а также всплеск кортикальной и двигательной активности снизилась до 2,8 [2,3-6,1]%, 0,01 [0,0-3,6]% и 8,5 [4,0-15,3]%, соответственно, по сравнению с контрольным уровнем (n = 9) (рис. 2).

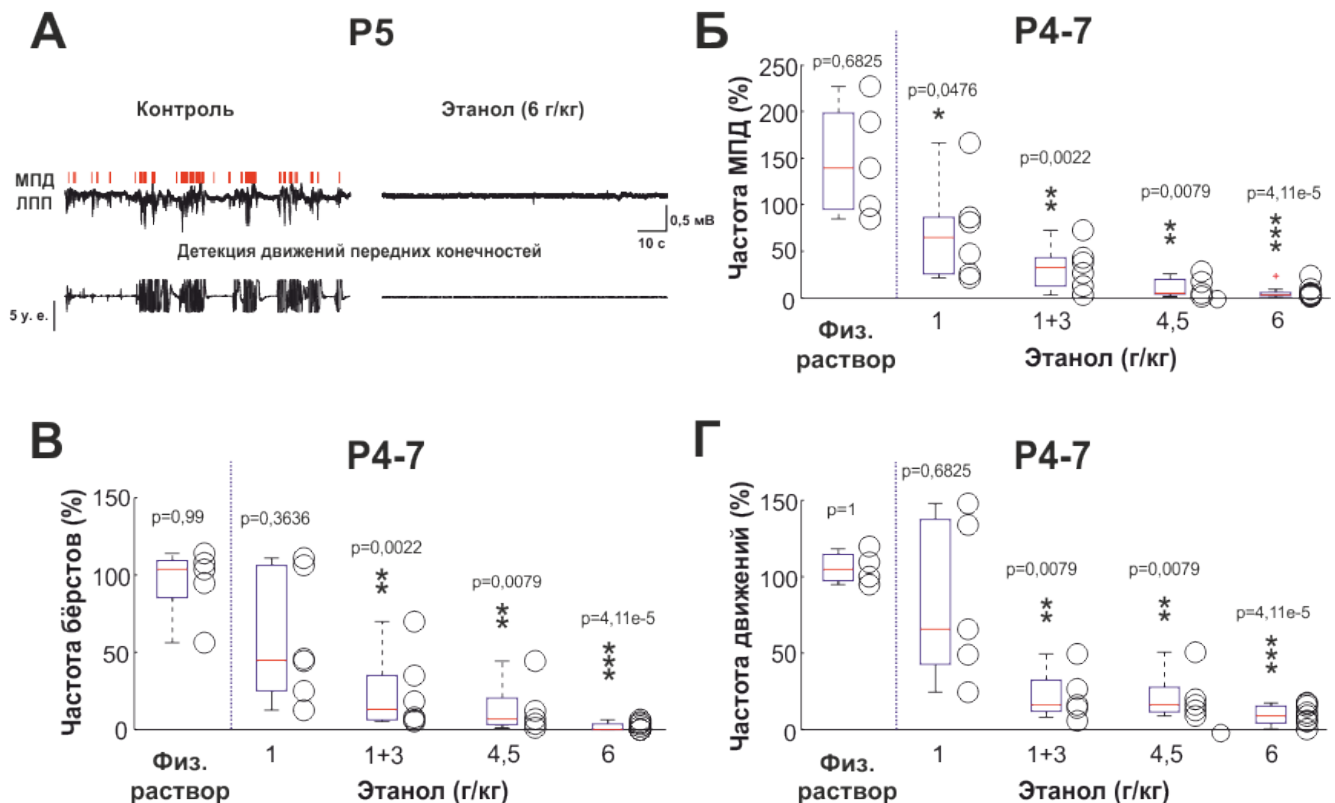


Рисунок 2 – Эффекты этанола на спонтанную активность S1 новорожденных крыс в возрасте P4-7. (А) Примеры записи спонтанной электрической активности в L4 области представительства передних конечностей S1 и механограммы двигательной активности крысы в возрасте P5 (ЛПП – локальные полевые потенциалы – черные линии; МПД – множественные потенциалы действия – красные вертикальные линии наверху; у.е. – условные единицы) в контрольных условиях (слева) и через 10 мин после введения этанола в концентрации 6 г/кг (20%, в/б) (справа). (Б) Влияние физиологического раствора и этанола на частоту возникновения множественных потенциалов действия. (В) Влияние физиологического раствора и этанола на частоту бёрстов. (Г) Влияние физиологического раствора и этанола на двигательную активность. Каждый не закрашенный кружок соответствует одному животному, боксы отображают медианное значение и ошибку в течение 15-минутного периода записи, нормированные к контрольным значениям, предшествующим инъекции физиологического раствора (в/б) или этанола (20%, в/б). (Б-Г) Представлены объединенные данные, полученные в области представительства передних конечностей и вибрисс крыс в возрасте P4-7 (n = 27) по истечении 1 часа после введения.

Для выявления возрастных особенностей влияния этанола исследовались эффекты этанола на кортикальную активность в S1 крыс возраста от P13 до P23. В контроле спонтанная активность коры в данный возрастной период становилась непрерывной. Наряду с этим по истечении первой недели после рождения наблюдалось исчезновение ранних паттернов активности, включающих веретенообразные и ранние гамма осцилляции. Количество спонтанных движений конечностей/тела уменьшалось с возрастом, что соответствовало исчезновению миоклонических подергиваний в процессе развития. В данной возрастной группе этанол (6 г/кг) оказывал тормозное влияние на непрерывную фоновую ЭЭГ активность, вызывая, медленные дельта волновые осцилляции и снижая активность нейронов S1 с 14,8 [11,7-17,0] до 2,4 [2,2-4,9]  $\text{с}^{-1}$  (P13-23,  $n = 5$ ,  $p = 0,008$ ). Частота спонтанных движений конечностей/тела под воздействием этанола уменьшалась с 1,50 [1,39-1,90] до 0,37 [0,07-0,49]  $\text{мин}^{-1}$  ( $p = 0,008$ ).

## **1.2 Влияние этанола на сенсорно вызванную электрическую активность первичной соматосенсорной коры крыс**

Кратковременная механическая стимуляция соматотопического участка кожи передней конечности или основной вибриссы в контроле вызвала в S1 комплексные ответы, включающие сенсорно вызванные потенциалы и следующие за ними гамма и веретенообразные осцилляции, ассоциированные с множественными потенциалами действия. Воздействие этанола на сенсорно вызванные ответы в S1 исследовалось с помощью нескольких возрастных групп животных. У крыс в возрасте P1-2 наблюдалось практически полное подавление этанолом сенсорно вызванных бёрстов. У животных в возрасте P4-7 этанол (6 г/кг) не оказывал влияния на амплитуду (в контроле: 536 [437-879] мкВ; при введении этанола: 434 [350-724] мкВ) (P4-7,  $n = 10$ ,  $p = 0,22$ ) и латентный период сенсорно вызванных потенциалов (в контроле: 36 [34-41] мс; при введении этанола: 41 [34-45] мс) (P4-7,  $n = 10$ ,  $p = 0,22$ ) (рис. 3). Небольшое уменьшение количества множественных потенциалов действия в ходе сенсорно вызванных потенциалов, наблюдаемое после инъекции этанола, не являлось статистически достоверным. В результате воздействия этанола наблюдалось уменьшение осцилляторного компонента ответов, вызванных сенсорной стимуляцией (рис. 3 А).

В процессе развития, сенсорно вызванные ответы становились более острыми и переставали сопровождаться бёрстами. У крыс в возрасте P13-23 этанол снижал амплитуду и увеличивал задержку сенсорно вызванных потенциалов, при этом количество множественных потенциалов действия во время и после сенсорно вызванных потенциалов сокращалось.

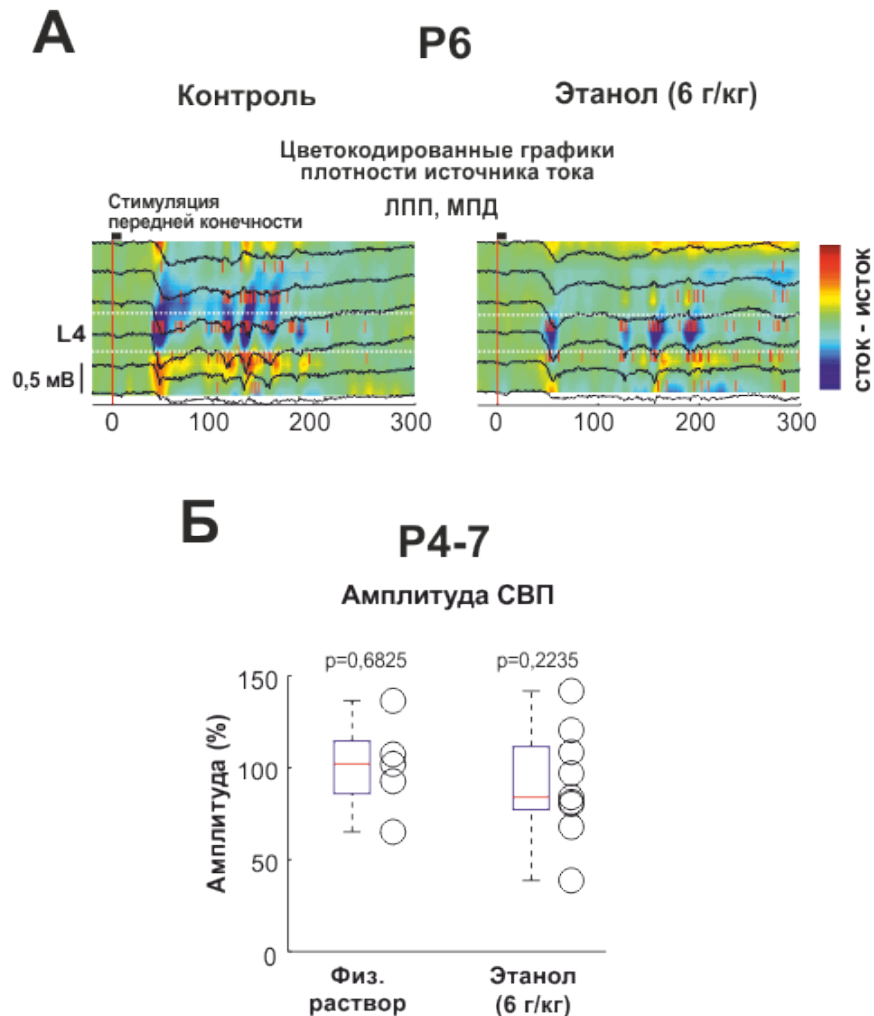


Рисунок 3 – Эффекты этанола (6 г/кг) на сенсорно вызванную активность в S1 новорожденных крыс. (А) Примеры записи сенсорных ответов, вызванных механической стимуляцией передней конечности, на различной кортикальной глубине в области представительства передних конечностей S1 крысы в возрасте P6 (ЛПП – локальные полевые потенциалы – черные линии; МПД – множественные потенциалы действия – красные вертикальные линии, наложенные на цветовую карту плотности источника тока) в контрольных условиях (слева) и через 1 час после инъекции этанола в концентрации 6 г/кг (20%, в/б) (справа). Начало стимула отмечено красной вертикальной линией. Границы L4 обозначены белым пунктиром. (Б) Влияние физиологического раствора и этанола (6 г/кг) на параметры сенсорно вызванных ответов в S1 новорожденных крыс. Каждый кружок соответствует одной крысе. Представлены объединенные данные о воздействии физиологического раствора (в/б) и этанола (20%, в/б), нормированные к контрольным значениям, полученные в области представительства передних конечностей и вибрисс S1 крыс в возрасте P4-7 по истечении 1 часа после введения (n = 10).

Таким образом, этанол в период первой недели жизни дозозависимым образом оказывает ингибирующее влияние на спонтанную активность, а также подавляет сенсорно вызванные осцилляции. При воздействии на крыс в возрасте P13-23 этанол в концентрации 6 г/кг обладает тормозным эффектом на непрерывную фоновую активность коры, вызывая, медленные дельта волновые осцилляции и снижая активность нейронов во всех слоях.

### 1.3 Исследование влияния этанола на апоптоз нейронов в первичной соматосенсорной коре крыс

В данной серии экспериментов исследовались нейроапоптогенные эффекты этанола в зависимости от используемой концентрации и возраста животных. Апоптоз нейронов оценивали путем окрашивания срезов мозга антителами к активированной каспазе-3 (Olney et al., 2002). Настоящее исследование показало, что у контрольных животных апоптозу подвергается сравнительно небольшое количество нейронов S1 головного мозга новорожденных крыс ( $17 \pm 7$  окрашенных нейронов/ $\text{мм}^3$ ) (P1-7,  $n = 7$ ).

Для изучения возрастной зависимости апоптотической нейродегенерации, инициированной этанолом, осуществлялись инъекции этанола (20%, в/б) в концентрации 6 г/кг (P1-17,  $n = 32$ ). По истечении 8 часов с момента введения (Olney et al., 2002) производилось окрашивание срезов мозга в области S1 с целью определения наличия активированной каспазы-3. Кроме того, срезы окрашивались красителем DAPI, связывающим хроматин. Изображения были получены с помощью конфокального микроскопа. Окрашенные нейроны характеризовались различной степенью морфологической дегенерации и повреждением ядра. Во многих из них наблюдалось скопление хроматина и формирование апоптозных телец, окрашенных DAPI, которые различались как тени на фоне свечения каспазы-3. Для того чтобы количественно охарактеризовать нейроапоптоз, учитывались только окрашенные клетки с дендритными ветвлениями, сохранившие четкие нейрональные морфологические особенности.

Зависимость процесса апоптотической нейродегенерации в S1 от возраста характеризовалась колоколообразной формой (рис. 4 Б). У крыс в возрасте P1 степень апоптоза была выражена слабо ( $119 \pm 63$  нейронов/ $\text{мм}^3$ ,  $n = 3$ ) и увеличивалась с возрастом, достигая своего пика на седьмой день после рождения ( $1235 \pm 284$  нейронов/ $\text{мм}^3$ ;  $n = 3$ ). Далее следовал спад и к возрасту P14-17 уровень нейродегенерации снижался до  $82 \pm 35$  нейронов/ $\text{мм}^3$  ( $n = 3$ ). Окрашенные нейроны присутствовали по всей глубине коры.

Концентрационная зависимость нейроапоптогенных эффектов этанола в S1 крыс в возрасте P5 была исследована при четырех режимах дозирования: 1 г/кг; 1 + 3 г/кг с интервалом в 1 час; 4,5 г/кг и 6 г/кг (рис. 4 В). В качестве контроля использовались крысы, которым вводился физиологический раствор (в/б) в объеме, эквивалентном инъекцируемому этанолу. Через 1 час после введения 1 г/кг этанола (20%, в/б) его уровень в крови достигал  $47,3 \pm 10,8$  мг/дл, однако, по истечении 4 часов концентрация этанола в крови возвращалась практически к нулевой отметке. При этом изменение количества окрашенных нейронов по отношению к контрольным значениям было недостоверным. Две последовательные инъекции 1 и 3 г/кг этанола с интервалом в 1 час вызывали повышение концентрации этанола в крови до  $350 \pm 89$  мг/дл ( $n = 3$ ) и  $311 \pm 52$  мг/дл ( $n = 3$ ) спустя 1 и 4 часа после первой инъекции, соответственно. Данный режим дозирования приводил к апоптозу  $74 \pm 11$  нейронов/ $\text{мм}^3$  ( $n = 3$ ). Схожие уровни нейродегенерации наблюдались при ведении 4,5 г/кг ( $75 \pm 9$  нейронов/ $\text{мм}^3$ ) ( $n = 3$ ) (рис. 4 В). Инъекция 6 г/кг этанола приводила к массивному

апоптозу ( $728 \pm 92$  нейронов/ $\text{мм}^3$ ) ( $n = 3$ ) (рис. 4 В), при этом концентрация этанола в крови превышала 300 мг/дл. Представленные результаты согласуются с ранее полученными данными, свидетельствующими о том, что апоптоз нервных клеток возникает при концентрации этанола в крови выше 200 мг/дл, сохраняющейся в течение нескольких часов (Ikonomidou et al., 2000).

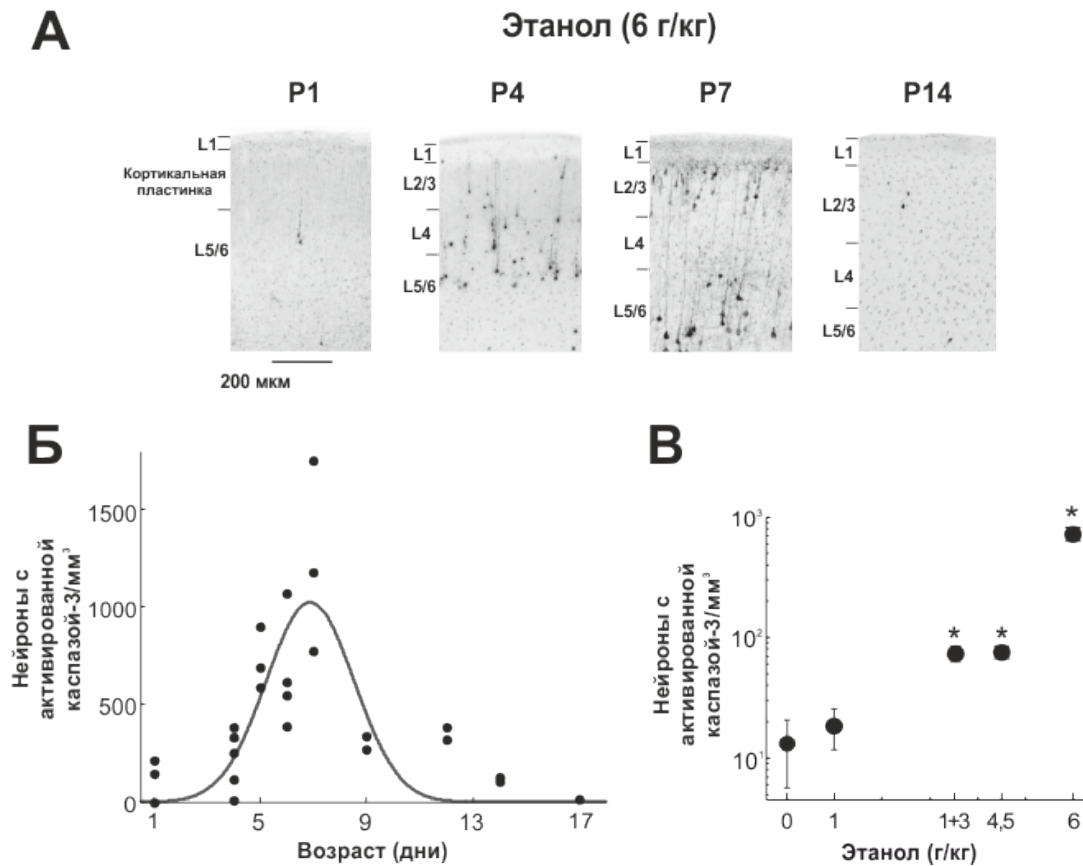


Рисунок 4 – Возрастная и концентрационная зависимости апоптотических процессов, инициированных этанолом, в представительстве вибрисс S1 крыс. (А) Гистологические срезы в области представительства вибрисс крыс разных возрастов, сделанные через восемь часов после введения этанола (20%, в/б). Окраска срезов осуществлялась посредством антител к активированной каспазе-3. (Б) Возрастная зависимость общей плотности окрашенных нейронов, подвергшихся воздействию этанола. Каждая точка соответствует одному животному ( $n = 32$ ). Наибольший уровень апоптотической нейродегенерации, вызванной этанолом, в S1 выявлялся у крыс в возрасте около P7. (В) Зависимость общей плотности окрашенных нейронов от дозы инъектируемого этанола. Объединенные данные, полученные в области представительства вибрисс S1 крыс в возрасте P5 ( $n = 15$ ).

Таким образом, этанол (20%, в/б) в концентрации 6 г/кг вызывает массивный апоптоз нейронов S1 крыс, который в наибольшей степени выражен в течение первой недели жизни, что соответствует ингибирующему влиянию данного вещества на кортикальную активность в этот период.



## 2. Влияние общих анестетиков на электрическую активность первичной соматосенсорной коры крыс

### 2.1 Эффекты изофлурана на спонтанную электрическую активность первичной соматосенсорной коры крыс

В следующей серии экспериментов проводился анализ влияния газового анестетика изофлурана на электрическую активность в представительстве вибрисс S1 крыс в течение первой недели жизни. Электрическая активность в контроле характеризовалась бёрстами, возникающими с частотой  $5,6 \pm 1,6 \text{ мин}^{-1}$ , включающими осцилляции в диапазоне гамма и альфа-бета частот, ассоциированными с множественными потенциалами действия (P2-7,  $n = 6$ ) (рис. 5). Эффекты изофлурана на спонтанные гамма и веретенообразные осцилляции характеризовались концентрационной зависимостью (рис. 5 А). В концентрации 0,5% изофлуран существенно не изменял частоту бёрстов и множественных потенциалов действия. При хирургических уровнях анестезии (1,5-2%) спонтанные веретенообразные и ранние гамма осцилляции у животных первой недели жизни полностью угнетались, при этом наблюдалось снижение мощности осцилляций в альфа-бета (8-30 Гц) и гамма (30-80 Гц) диапазонах с  $21 \pm 4 \text{ мкВ}^2/\text{Гц}$  до  $3 \pm 1 \text{ мкВ}^2/\text{Гц}$  и с  $2,6 \pm 0,7 \text{ мкВ}^2/\text{Гц}$  до  $0,6 \pm 0,1 \text{ мкВ}^2/\text{Гц}$ , соответственно ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ) (рис. 5). Снижение активности сопровождалось практически полным исчезновением множественных потенциалов действия, частота которых уменьшилась с  $5,5 \pm 2,3 \text{ с}^{-1}$  до  $0,1 \pm 0,1 \text{ с}^{-1}$  ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ) (рис. 5).

Для выявления возрастной зависимости эффектов изофлурана (1,5-2%) были использованы животные следующих возрастных групп: P2-7, P8-15 и P16-69 (рис. 5 Б). У крыс в возрасте P2-5 в результате воздействия изофлурана спонтанная активность была полностью подавлена, однако, к концу первой недели жизни наблюдалось возникновение редких ( $0,7 \pm 0,3 \text{ мин}^{-1}$ ) спонтанных высокоамплитудных потенциалов (амплитуда  $226 \pm 123 \text{ мкВ}$ ; полудлительность  $20 \pm 10 \text{ мс}$ ), сопровождавшихся разрядами отдельных нейронов ( $n = 2$ ).

Начиная со второй постнатальной недели, спонтанная активность в контроле становилась непрерывной. Ингаляция изофлураном приводила к появлению высокоамплитудных потенциалов (амплитуда  $797 \pm 219 \text{ мкВ}$ ), возникавших с частотой  $6,6 \pm 2,6 \text{ мин}^{-1}$  и синхронизировавших множественные потенциалы действия (P8-15,  $n = 5$ ). Частота и амплитуда высокоамплитудных потенциалов увеличивалась с возрастом. В отличие от новорожденных крыс, у которых изофлуран практически полностью угнетал электрическую активность, у более взрослых животных высокоамплитудные потенциалы и бёрсты поддерживали частоту множественных потенциалов действия на достаточно высоком уровне ( $2,0 \pm 0,7 \text{ с}^{-1}$  у P8-15 и  $8,4 \pm 3,2 \text{ с}^{-1}$  у P16-69). На третьей недели жизни изофлуран вызывал паттерны гиперсинхронных эпилептиформных разрядов, которые состояли из периода высокоамплитудной активности и сопровождались периодом изoeлектрической ЭЭГ (англ. «burst-suppression patterns», Ferron et al., 2009; Amzica et al., 2009). Возникновение данных паттернов наблюдалось с частотой  $23,5 \pm 6,6 \text{ мин}^{-1}$ , при этом частота осцилляций в пределах одного бёрста составляла  $12,5 \pm 3,0 \text{ Гц}$  (P16-69,  $n = 9$ ).

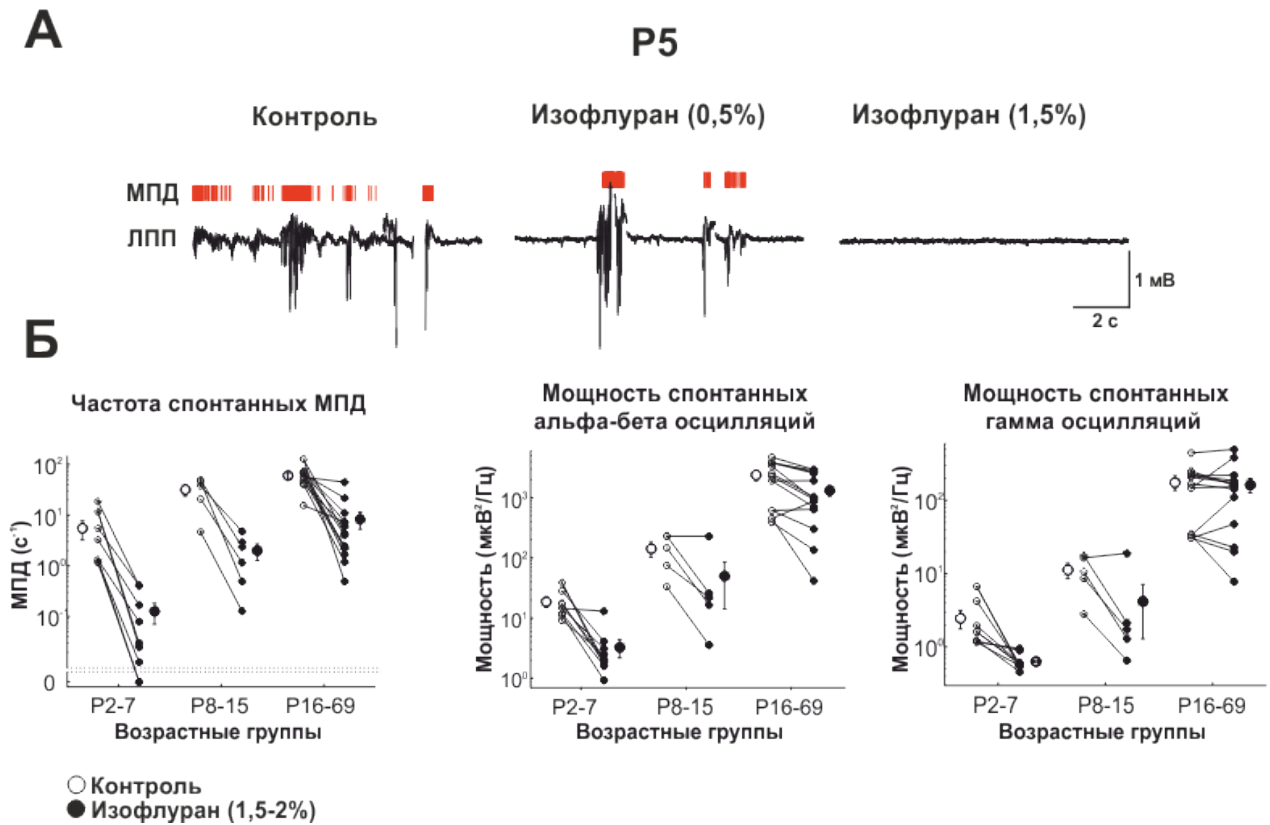


Рисунок 5 – Эффекты изофлурана (0,5-2%) на спонтанную активность в представительстве вибрисс S1 новорожденной крысы. (А) Примеры записи спонтанной электрической активности в L4 кортикальной колонки мозга крысы в возрасте P5 (ЛПП – локальные полевые потенциалы – черные линии; МПД – множественные потенциалы действия – красные вертикальные линии наверху) в контрольных условиях (слева) и при ингаляции изофлураном в концентрации 0,5% (по центру) и 1,5% (справа). (Б) Возрастная зависимость эффектов изофлурана (1,5-2%) на параметры спонтанной электрической активности мозга крыс.

## 2.2 Влияние изофлурана на сенсорно вызванную электрическую активность первичной соматосенсорной коры крыс

В период первой недели жизни изофлуран подавлял не только спонтанную, но также полностью блокировал сенсорно вызванные осцилляции. Снижение мощности сенсорно вызванных осцилляций (как ранних гамма, так и веретенообразных) зависело от концентрации; полное подавление наблюдалось при подаче изофлурана в концентрации 1,5-2% (рис. 6).

У крыс в возрасте P2-7 мощность вызванных гамма и веретенообразных осцилляций уменьшалась с  $46 \pm 17$  мкВ<sup>2</sup>/Гц до  $0,8 \pm 0,2$  мкВ<sup>2</sup>/Гц и с  $237 \pm 96$  мкВ<sup>2</sup>/Гц до  $8 \pm 3$  мкВ<sup>2</sup>/Гц, соответственно ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ) (рис. 6 А), что сопровождалось снижением количества множественных потенциалов действия с  $35,6 \pm 13,8$  до  $0,9 \pm 0,5$  ( $n = 6$ ,  $p < 0,01$ ) (рис. 6 А). При этом амплитуда сенсорно вызванных потенциалов сохранялась без изменений. В контрольных условиях и при действии изофлурана (1,5-2%) амплитуда сенсорно вызванных потенциалов составляла  $601 \pm 158$  мкВ и  $700 \pm 154$  мкВ, соответственно ( $n = 6$ ) (рис. 6 Б). Количество множественных потенциалов действия в ходе сенсорно вызванных потенциалов также изменялось недостоверно.

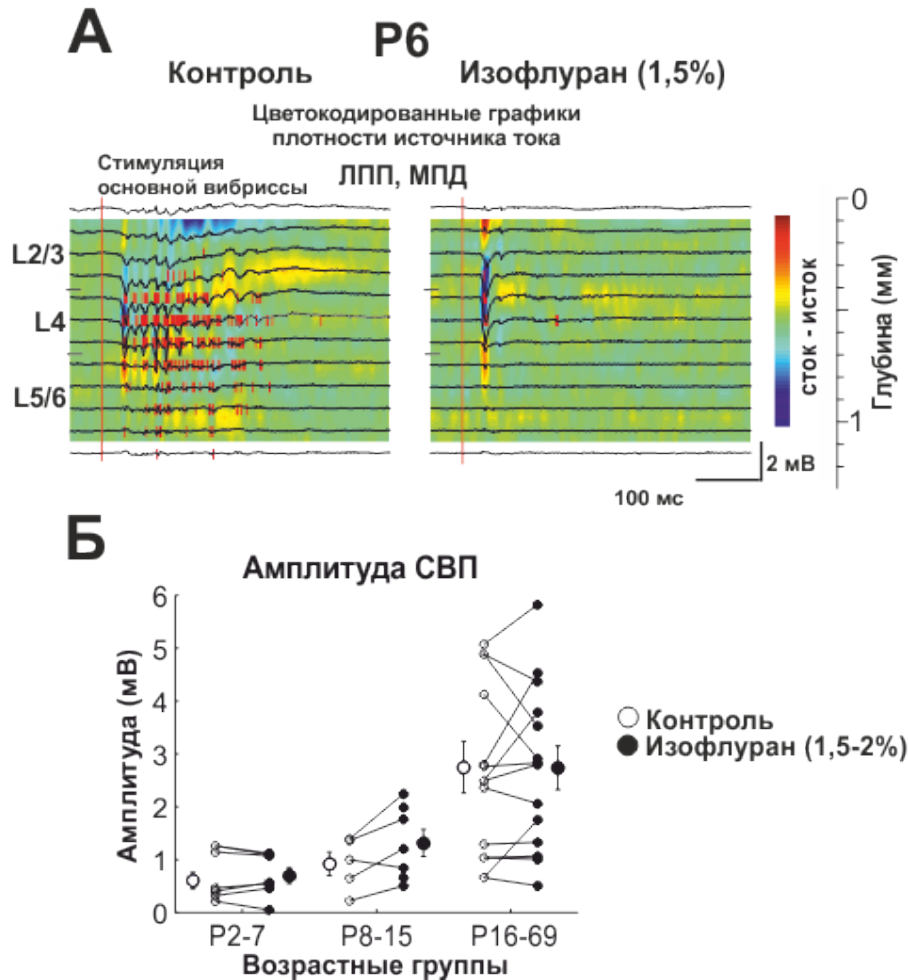


Рисунок 6 – Эффекты изофлурана (1,5%) на сенсорные ответы в представительстве вибрисс S1 новорожденной крысы. (А) Примеры записи сенсорных ответов, вызванных стимуляцией основной вибриссы, на разной глубине кортикальной колонки мозга крысы в возрасте Р6 (ЛПП – локальные полевые потенциалы – черные линии; МПД – множественные потенциалы действия – красные вертикальные линии, наложенные на цветовую карту плотности источника тока), в контрольных условиях (слева) и при действии изофлурана (справа). (Б) Возрастная зависимость эффектов изофлурана (1,5-2%) на амплитуду СВП – сенсорно вызванных потенциалов. Каждая пара соответствует одной крысе, круги со стандартными ошибками отражают усреднения по возрастным группам: P2-7, P8-15, P16-69.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при хирургических уровнях анестезии (1,5-2%) изофлуран вызывает полное подавление спонтанной активности, а также осцилляторного компонента, вызванного сенсорной стимуляцией, в S1 крыс в период первой недели после рождения, в то время как у более взрослых животных в результате воздействия анестетика наблюдается возникновение паттернов эпилептиформных разрядов.

### **2.3 Исследование влияния комбинированного введения кетамина и мидазолама на электрическую активность первичной соматосенсорной коры новорожденных крыс**

Для исследования влияния кетамина и мидазолама на электрическую активность коры новорожденных крыс данные вещества вводились (в/б) в концентрациях, эквивалентных дозам, применяемым для хирургической анестезии: 40 мг/кг и 9 мг/кг, соответственно. Регистрация электрической активности проводилась в области представительства передних конечностей.

В контрольных условиях активность в соматосенсорной коре новорожденных крыс характеризовалась бёрстами (с частотой  $5,2 \pm 1,2$  мин<sup>-1</sup> и длительностью  $2155 \pm 416$  мс), включающими осцилляции в диапазоне гамма и альфа-бета частот, ассоциированными с множественными потенциалами действия (P5-7, n = 6) (рис. 7 А). Комбинированное введение кетамина (40 мг/кг) и мидазолама (9 мг/кг) (в/б) приводило к значительному снижению спонтанной электрической активности уже в первые минуты после инъекции (рис. 7) и затем в большинстве экспериментов к полному её исчезновению. Средняя частота возникновения множественных потенциалов действия снижалась с  $2,5 \pm 0,7$  до  $0,2 \pm 0,1$  с<sup>-1</sup> (до  $11 \pm 5\%$ ) (n = 6, p < 0,01), частота возникновения бёрстов снижалась с  $5,2 \pm 1,2$  до  $0,2 \pm 0,1$  мин<sup>-1</sup> (до  $6 \pm 4\%$ ) (n = 6, p < 0,01). Анализ механограммы спонтанной двигательной активности также выявил снижение частоты миоклонических движений животного до  $10 \pm 3\%$  (в контроле:  $10,5 \pm 1,3$ , при действии анестетиков:  $1,0 \pm 0,4$  мин<sup>-1</sup>) (n = 6, p < 0,01). Значительное подавление кортикальной активности наблюдалось в течение 3 часов после введения анестетиков (рис. 7).

Эффект комбинированного введения исследуемых анестетиков на сенсорно вызванную активность был менее выражен. Изменения амплитуды и задержки сенсорно вызванных потенциалов были недостоверными. Однако значительно снижалась осцилляторная составляющая сенсорного ответа относительно контроля: мощность осцилляций в гамма частоте в среднем уменьшилась до  $19 \pm 4\%$  (n = 6, p < 0,01), в диапазоне альфа-бета частот – до  $14 \pm 4\%$  (n = 6, p < 0,01). Частота множественных потенциалов действия, возникавших во время сенсорно вызванных потенциалов, в среднем снижалась до  $50 \pm 10\%$  (n = 6, p < 0,01), частота множественных потенциалов действия, возникавших в ходе сенсорно вызванных бёрстов, снижалась до  $5 \pm 3\%$  (n = 6, p < 0,01) по отношению к контрольным значениям.

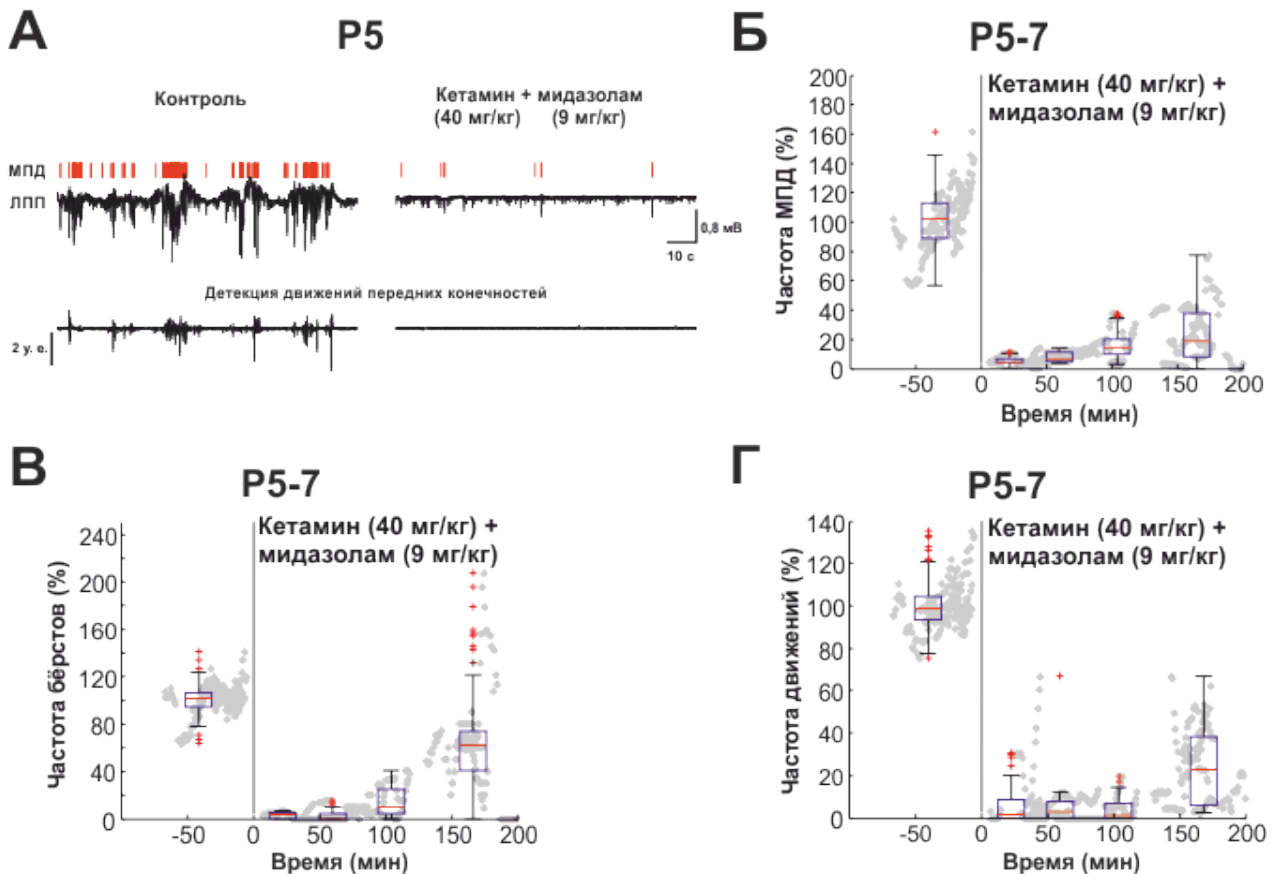


Рисунок 7 – Эффекты кетамина (40мг/кг) в сочетании с мидазоломом (9 мг/кг) на спонтанную активность S1 новорожденной крысы. (А) Примеры записи электрической активности в L4 области представительства передних конечностей S1 и механограммы двигательной активности крысы в возрасте P5 (ЛПП – локальные полевые потенциалы – черные линии; МПД – множественные потенциалы действия – красные вертикальные линии наверху; у. е. – условные единицы) в контроле (слева) и через 3 мин после инъекции кетамина в комбинации с мидазоломом (в/б) (справа). (Б) Влияние комбинированного введения анестетиков на частоту множественных потенциалов действия. (В) Влияние комбинированного введения анестетиков на частоту возникновения бёрстов. (Г) Эффект комбинированного введения анестетиков на частоту спонтанных движений. Каждая серая точка представляет скользящее среднее значение параметра. Вертикальной линией обозначен момент инъекции комбинации анестетиков (в/б). Точки до момента времени  $t = 0$  соответствуют контрольным условиям. Представлены объединённые данные, полученные в области представительства передних конечностей S1 крыс в возрасте P5-P7, нормированные к контрольным значениям ( $n = 6$ ).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что комбинация кетамина (40 мг/кг) и мидазолама (9 мг/кг), в дозах, применяемых для хирургической анестезии, вызывает практически полное подавление спонтанной электрической активности, а также значительное снижение осцилляторной составляющей вызванного ответа в S1 новорожденных крыс.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительное исследование возрастной и концентрационной зависимостей влияния этанола на активность первичной соматосенсорной коры и его нейроапоптогенных эффектов выявило, что в период наиболее мощного нейротоксического воздействия (P4-7), этанол полностью подавляет работу первичной соматосенсорной коры. Также было показано, что дозозависимость нейроапоптотических эффектов этанола в данной возрастной группе коррелирует с его ингибирующим действием на нейрональную активность. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о наличии непосредственной связи между нейроапоптотическими эффектами этанола и подавлением активности нейронов в критический период развития.

Ингаляция изофлураном, а также введение комбинации общих анестетиков кетамин и мидазолам в клинически релевантных концентрациях на протяжении первой постнатальной недели приводят к полному угнетению спонтанной активности коры и сенсорно вызванных осцилляций, при этом у более взрослых животных изофлуран вызывает паттерны эпилептиформных разрядов.

Эффекты этанола и анестетиков общего действия, включая изофлуран, кетамин, мидазолам, связаны модуляцией целого ряда ионных каналов и рецепторов, в том числе, с блокированием НМДА рецепторов и активацией ГАМК-А рецепторов, что приводит к угнетению электрической активности развивающегося мозга. Известно, что жизнеспособность многих центральных и периферических нейронов критически зависит от электрической активности, которая подавляет апоптотические механизмы, повышает антиоксидантную защиту, а также активирует  $\text{Ca}^{2+}$  зависимые процессы регуляции экспрессии проапоптотических генов (Papadia et al., 2008; Papadia et al., 2005). Поэтому можно предположить, что в основе нейроапоптотических эффектов этанола и анестетиков лежит специфическое для раннего возраста подавление кортикальной активности, которое отражает уникальную и высокую чувствительность механизмов генерации ранних паттернов активности к алкоголю и общей анестезии.

В соответствии с полученными результатами можно сделать заключение о том, что этанол, а также общие анестетики, широко используемые в клинической практике, в том числе в педиатрии, ингибируют электрическую активность мозга плода и могут оказывать неблагоприятные нейродегенеративные воздействия на процесс внутриутробного развития, что впоследствии может приводить к возникновению различных нарушений.

## ВЫВОДЫ

1. Этанол в период первой недели после рождения подавляет спонтанные и сенсорно вызванные осцилляторные вспышки активности, а также вызывает апоптоз нейронов первичной соматосенсорной коры крыс дозозависимым образом (в концентрациях от 1 до 6 г/кг).

2. Концентрационная зависимость нейроапоптогенных эффектов этанола в критический период развития первичной соматосенсорной коры крыс (от 4 до 7 постнатальных дней) коррелирует со степенью ингибирования электрической активности.

3. Этанол в концентрации 6 г/кг в течение третьей недели после рождения оказывает тормозное влияние на непрерывную фоновую ЭЭГ активность первичной соматосенсорной коры крыс, вызывая медленные дельта волновые осцилляции и снижая активность нейронов во всех слоях.

4. Изофлуран в концентрации 1,5-2%, соответствующей уровню хирургической анестезии, полностью подавляет спонтанные ранние гамма и веретенообразные осцилляции, а также блокирует сенсорно вызванные осцилляторные ответы в первичной соматосенсорной коре крыс в период первой недели постнатального развития.

5. В результате воздействия изофлурана (1,5-2%) в течение третьей недели жизни у крыс в первичной соматосенсорной коре возникают паттерны эпилептиформных разрядов, чередующихся с периодами подавления активности.

6. Комбинированное введение клинически релевантных доз общих анестетиков – кетамина (40 мг/кг) и мидазолама (9 мг/кг), применяемых для хирургической анестезии, приводит к практически полному подавлению спонтанной электрической активности, а также к снижению осцилляторной составляющей вызванного сенсорной стимуляцией ответа в первичной соматосенсорной коре головного мозга новорожденных крыс во время первой постнатальной недели.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных журналах, включенных в систему цитирования Web of Science и рекомендованных ВАК

1) Inhibition of Cortical Activity and Apoptosis Caused by Ethanol in Neonatal Rats In Vivo / **Lebedeva J.**, Zakharov A., Ogievetsky E., Minlebaeva A., Kurbanov R., Gerasimova E., Sitdikova G., Khazipov R. // *Cerebral Cortex*. – New York, USA. – 2015. – P 1-15. – DOI: 10.1093/cercor/bhv293. – 0,88 п. л. (лично соискателем – 0,45).

2) Ketamine-Midazolam Anesthesia Induces Total Inhibition of Cortical Activity in the Brain of Newborn Rats / **Lebedeva Yu.A.**, Zakharova A.V., Sitdikova G.F., Zefirov A.L., Khazipov R.N. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – Moscow, Russia. – 2016. – V. 161, Is. 1. – P 15-19. – DOI: 10.1007/s10517-016-3334-1. – 0,25 п. л. (лично соискателем – 0,16).

3) Gamma Oscillations in the Somatosensory Cortex of Newborn Rats / Gerasimova E.V., Zakharov A.V., **Lebedeva Yu.A.**, Inacio A.R. , Minlebaev M.G., Sitdikova G.F., Khazipov R.N. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – Moscow, Russia. – 2014. – V. 156, Is. 3. – P. 295-298. – DOI: 10.1007/s10517-014-2333-3. – 0,19 п. л. (лично соискателем – 0,04).

4) Isoflurane suppresses early cortical activity / Sitdikova G., Zakharov A., Janackova S., Gerasimova E., **Lebedeva J.**, Inacio A. R., Zaynutdinova D., Minlebaev M., Holmes G. L., Khazipov R. // *Annals of Clinical and Translational Neurology*. – USA. – 2014. – V. 1, Is. 1. – P. 15-26. – DOI: 10.1002/acn3.16. – 0,69 п. л. (лично соискателем – 0,15).

5) Sensory feedback synchronizes motor and sensory neuronal networks in the neonatal rat spinal cord / Ina'cio A.R., Nasretidinov A., **Lebedeva J.**, Khazipov R. // *Nature Communications*. – England. – 2016. – V. 7: 13060. – P. 1-14. – DOI: 10.1038/ncomms13060. – 0,88 п. л. (лично соискателем – 0,16).

### Тезисы в сборниках материалов конференций

1) Развитие эффектов изофлурана на электрическую активность коры головного мозга у новорожденных и взрослых животных / **Лебедева Ю.А.**, Герасимова Е.В., Захаров А.В., Ситдикова Г.Ф., Хазипов Р.Н. // Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». Сборник статей. – Пущино, Россия. – 2015 г. – Т. 1. – С. 640-645. – 0,29 п. л. (лично соискателем – 0,1).

2) Паттерны осцилляторной вызванной и спонтанной электрической активности в соматосенсорной коре новорожденных крысят / **Лебедева Ю.А.**, Герасимова Е.В., Захаров А.В., Ситдикова Г.Ф., Хазипов Р.Н. // XXII Съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова. Тезисы докладов. – Волгоград, Россия. – 2013 г. – С. 293-294. – 0,04 п. л. (лично соискателем – 0,01).



3) Сенсорно-моторная интеграция в спинном мозге новорожденных крыс / Насретдинов А.Р., Инасио А.Р., **Лебедева Ю.А.**, Хазипов Р.Н. // Материалы Международной конференции «Трансляционная медицина 2016». – Казань, Россия. – 2016 г. – С. 75. – 0,03 п. л. (лично соискателем – 0,01).

4) Влияние этанола на электрическую активность соматосенсорной коры новорожденных крысят / **Лебедева Ю.А.**, Захаров А.В., Герасимова Е.В., Хазипов Р.Н., Ситдикова Г.Ф. // Материалы XII Международной научной школы-конференции «Адаптация растущего организма». – Казань, Россия. – 2014 г. – С. 61-62. – 0,09 п. л. (лично соискателем – 0,06).

5) Ранние гамма-осцилляции в представительстве конечностей соматосенсорной коры новорожденных крысят. / Герасимова Е.В., **Лебедева Ю.А.**, Ситдикова Г.Ф., Захаров А.В., Хазипов Р.Н. // Академический журнал Западной Сибири. – 2012 г. – № 6. – С. 62-63. – 0,08 п. л. (лично соискателем – 0,02).

6) Ethanol Effects on Spontaneous and Evoked Electrical Activity in Somatosensory Cortex of Neonatal Rats / **Lebedeva J.A.**, Zakharov A.V., Gerasimova E.V., Sitdikova G.F., Khazipov R.N.. // ActaNaturae. Спецвыпуск 2014. Тезисы конференции «Наука будущего», 17-20 сентября 2014 г., Санкт-Петербург. – 2014. – Р. 90. – 0,03 п. л. (лично соискателем – 0,02).

7) Sensory feedback by spontaneous muscle twitches in neonatal rats / Inácio A.R., Nasretudinov A.R., **Lebedeva J.A.**, Khazipov R.N. // ActaNaturae. Спецвыпуск 2014. Тезисы конференции «Наука будущего», 17-20 сентября 2014 г., Санкт-Петербург. – 2014. – Р. 97. – 0,03 п. л. (лично соискателем – 0,01).

8) Isoflurane Completely Suppresses Gamma and Spindle Bursts During the First Postnatal Week / Gerasimova E.V., Sitdikova G.F., **Lebedeva J.A.**, Zakharov A.V., Khazipov R.N. // International Symposium «Biological Motility: new facts and hypotheses». – Pushchino, Russia. – 2014. – Р. 81-86. – 0,23 п. л. (лично соискателем – 0,06).

e-mail автора: julia.lebedevafg@yandex.ru